

## 学位論文題名

簡便で効率的なアデノウイルス  
cDNA 発現ライブラリーの構築法

## 学位論文内容の要旨

近年のゲノム解析及び生物学的情報の発展に伴い、機能不明の多数の遺伝子が確認されており、今後ますます生物学的機能の面から遺伝子を探索する効率の良い方法の開発が望まれている。アデノウイルスベクターはプラスミド及びレトロウイルスベクターによる遺伝子導入法に比べ、幅広い宿主細胞に対して高い感染効率を有し、遺伝子導入効率も高いことから cDNA ライブラリーのベクターとして有望視されていたが、作製法の煩雑さもありライブラリーの開発は成功していなかった。今回 *in vitro* での Cre-lox 反応を基盤としたアデノウイルスベクター作製法を改良し、簡便で効率的なアデノウイルス cDNA ライブラリーの構築法を確立した。このシステムではシャトルプラスミド cDNA ライブラリーと自己複製能を無くしたアデノウイルス DNA-末端蛋白質複合体 (left-end digested adenoviral DNA-TPC) とを Cre 組み換え酵素下に反応させ、*in vitro* で全長のアデノウイルス DNA ライブラリーを構築したのちウイルス産生能力の高い 293 細胞クローンに導入する。導入後約 1 週間でアデノウイルス cDNA ライブラリーが完成する。このライブラリー作製システムを用いて、ヒト T 細胞で約 1/3000 以下の頻度で存在する CD2 抗原遺伝子のクローニングが可能であった。本システムの開発により、さまざまな目的で機能的解析から遺伝子をクローニングすることが可能になると考えられる。

## 【方法と結果】

まずアデノウイルスベクター産生の至適条件を、1) *In vitro* での Cre 組み換え酵素反応効率、2) 293 細胞への遺伝子導入法、3) アデノウイルス産生に適した 293 クローンの同定、4) アデノウイルス末端蛋白質付加によるウイルス産生能の増強、に関して検討し、さらに本システムで実際に遺伝子クローニングが可能かどうか検討した。1) では、Cre 酵素量 : DNA 1  $\mu\text{g}$  に対し 2 ユニット、反応液量 : DNA 1  $\mu\text{g}$  に対し 30  $\mu\text{l}$ 、プラスミドとコスミドのモル比 : 1 対 1、反応時間 : 3 時間、とした条件が至適条件であった。2) では、リン酸カルシウム法 3 方法、リポフェクション法、ポリフェクション法、及びエレクトロポレーション法を用い、導入遺伝子量を変えて検討したところ、リン酸カルシウム法 (CellPfect Transfection Kit) で、DNA を 10  $\mu\text{g}$  使用した条件が至適条件であった。3) では、ウイルス産生能の早い 293 細胞を 100 細胞株の中から 6 クローン選り出し、プラーク形成数から特に産生能が高いクローン 38, 77 及び親 293 細胞を用いて希釈実験を行った。シャトルプラスミド pAdCMV-EGFP と pAdCMV-AP を種々の割合 (1: 30, 1: 100, 1: 300, 1: 3 x 10<sup>3</sup>) で混合した後、ウイルス産生能を検討したところ、親 293 細胞では 1: 30 希釈までしか EGFP 発現アデノウイルス産生が認められなかったのに対し、クローン 38 では 1: 3 x 10<sup>3</sup> 希釈まで確認され、ウイルス産生能の高いクローン細胞株の樹立に成功し

た。4) では pAdCMV-EGFP を pAdCMV-AP あるいはヒト T 細胞シャトルプラスミドライブラリーと種々の比率で混合した後、left-end digested adenoviral DNA-TPC と Cre 酵素下に反応させ、クローン 38 及び親 293 細胞に導入した。クローン 38 では  $1:3 \times 10^4 \sim 1:3 \times 10^5$  の比率で混合した EGFP 遺伝子までアデノウイルスとして発現が認められ、末端蛋白質を用いない場合は明らかにウイルス産生能が低かった。以上の実験はこれら至適条件下でこのシステムが細胞由来のほぼ全ての mRNA を網羅し、効率よくアデノウイルスライブラリーを構築しうることを示している。

次に、本システムを用いて実際にヒト T 細胞から CD2 遺伝子のクローニングを試みた。シャトルプラスミドライブラリーを 1 プールに約 100 コロニーが含まれるように 96 個のプールに分け、それぞれのプールを left-end digested adenoviral DNA-TPC と Cre 酵素下に反応させ、96 穴プレート上で 293 細胞クローン 38 にリン酸カルシウム法で導入した。導入後 8 日目それぞれからウイルス液を抽出後、96 穴プレート上に培養した膀胱癌細胞株 AsPC-1 に感染させた。48 時間後ヒト CD2 抗体を用いて免疫染色を行ったところ、3 つのプールで染色陽性であり CD2 抗原の発現が認められた。次に CD2 陽性シャトルプラスミドプール中の 96 クローンをそれぞれ left-end digested adenoviral DNA-TPC と反応させ、今度は 1 プールに 1 クローンのみが存在するように 96 穴プレート上でクローン 38 に導入した。一回目と同様にスクリーニングを行い、CD2 遺伝子を単独で含むシャトルプラスミドプールを同定し、さらにシーケンスによる解析から CD2 遺伝子であることを確認した。

#### 【考察】

本研究では、アデノウイルス産生能力の高いクローン細胞株の樹立に成功した。ウイルス産生を高める宿主側因子として、cellular transcription factors I (NF I) 及び III (NF III/Oct I) が報告されているが、RT-PCR 解析ではこれらの因子の発現レベルは親 293 細胞とクローン細胞とで同等であり、ウイルス産生能を増強する機序は不明であった。一方、遺伝子導入効率はクローン株で親 293 細胞に比べ 2~3 倍高くなっており、このことがアデノウイルス産生能増強の一因になっている可能性が示唆された。末端蛋白質の作用としては感染効率を上げるほか、複製の際のテンプレートとしての働きが報告されており、本実験では末端蛋白質の導入によりアデノウイルスコスミドの場合と比べてウイルス産生能は格段に増強された。今回開発したアデノウイルスライブラリー作製システムにより、従来の遺伝子発現クローニング法で不可能であった遺伝子探索が可能になると考えられる。まず、アデノウイルスの広い宿主感染力はプラスミドやレトロウイルスでは限られていたスクリーニング法の選択を広くする。またアデノウイルスベクターは *in vivo* での遺伝子導入も可能であり、今後 *in vivo* での遺伝子探索システムに発展できる可能性がある。さらに、近年ファイバー蛋白質の改変により細胞特異的感染性を持たせたアデノウイルスベクターの開発が進められているが、多くの異なった改変ファイバーを発現するアデノウイルスベクターライブラリーを作製して、細胞・組織特異的アデノウイルスベクターの同定が可能になるかもしれない。

以上、この効率的なアデノウイルスライブラリー作製法の開発により、さまざまな目的に対し、生物学的特異的機能に基づいた遺伝子探索が可能になるものと考えられた。

#### 【結語】

1. 簡便で効率的なアデノウイルス cDNA 発現ライブラリー構築法を確立した。
2. アデノウイルス作製システムを改良することにより、シャトルプラスミドライブラリーの段階で  $1:3 \times 10^4$  の頻度で存在する遺伝子でさえも効率よくアデノウイルスライブラリーとして

構築できた。

3. 本システムを用いて、ヒトT細胞で $1:0.3 \times 10^4$ 以下の頻度で存在するCD2抗原遺伝子のクローニングが可能であった。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博  
副 査 教 授 今 村 雅 寛  
副 査 教 授 秋 田 弘 俊

学 位 論 文 題 名

## 簡便で効率的なアデノウイルス cDNA 発現ライブラリーの構築法

アデノウイルスベクターはプラスミド及びレトロウイルスベクターによる遺伝子導入法に比べ、幅広い宿主細胞に対して高い感染効率を有し、遺伝子導入効率も高いことから cDNA ライブラリーのベクターとして有望視されていたが、作製法の煩雑さもありライブラリーの開発は成功していない。本研究では *in vitro* での Cre-lox 反応を基盤としたアデノウイルスベクター作製法を改良し、これまでに報告のない cDNA 発現ライブラリーの構築法を確立した。さらにそのシステムを用いて実際に遺伝子クローニングが可能であることを示した。本アデノウイルスベクター作製法では目的遺伝子を組み込んだシヤトルプラスミドとアデノウイルスコスミドを Cre 組み換え酵素下に反応させ、*in vitro* で全長の組み換えアデノウイルス DNA を構築したのち、293 細胞に導入する。導入後数日で目的のアデノウイルスベクターが産生される。このベクター作製法の至適条件を、1) *In vitro* での Cre 組み換え酵素反応、2) 293 細胞への遺伝子導入法、3) アデノウイルス産生に適した 293 クローンの同定、4) アデノウイルス末端蛋白質の利用、に関して検討し改良を行った。その結果、1/30,000 以下の頻度で混合した cDNA でさえも効率よくアデノウイルスベクターとして産生することが可能であり、多数の遺伝子を網羅する質の高いアデノウイルスライブラリーを構築することができた。次に、本システムを用いて実際にヒト T 細胞アデノウイルスライブラリーを作製して CD2 遺伝子のクローニングを試みた。CD2 遺伝子は T 細胞において約 1/10,000 の頻度で存在する遺伝子と報告されている。96 穴プレート上でアデノウイルスライブラリーを作製し、2 回の免疫染色によるスクリーニングで単独の遺伝子を含むプールを同定した。このプールから DNA を抽出しシーケンスによる解析から CD2 遺伝子であることを確認し、

実際に遺伝子クローニングが可能であることを示した。

口頭発表に際し、副査の今村教授より、新しいテクニックを用いた興味深い研究であるとのコメントの後、これまでのアデノウイルス作製法と比較してどのような違いがあるのか、さらに効率の良い方法を開発し、より頻度の低い遺伝子を探索することは可能かとの質問があった。学位申請者は従来の相同組み換え法を利用したアデノウイルス作製法に比べ、本作製法は約 2 週間で完成する非常に簡便な方法であること、また末端蛋白質の扱いをさらに研究することにより哺乳類の遺伝子をほぼ網羅する探索が可能になると回答した。

次に、副査の秋田教授より、将来性があり興味深い内容とのコメントを頂いたのち、ウイルス産生に適した 293 細胞クローンの特質、末端蛋白質の機能について質問があった。学位申請者はクローン宿主細胞が持つ核内蛋白 NF-1, NF-3 がアデノウイルス複製効率を上げている可能性を説明した。末端蛋白室に関しては、アデノウイルス複製の際のテンプレートとしての働き、エクソヌクレアーゼから DNA を保護する働きにより、やはりウイルス複製を数百倍あげることを回答した。

また、主査の浅香教授より本ライブラリーを用いての応用及び展望、また *in vivo* のアデノウイルス利用における安全性に関する質問があった。学位申請者は本アデノウイルスライブラリー作製システムを用いて、新規癌抗原同定や、組織特異的アデノウイルスベクター作製への応用の可能性を説明し、また、アデノウイルス自体の安全性に関しては今なお検討課題であると回答した。

本研究は、アデノウイルス cDNA 発現ライブラリーの構築法を確立し、その実用性を示したという点で高く評価され、今後さまざまな目的に対し、生物学的機能に基づいた遺伝子探索が可能になるものと考えられた。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。